



Kwas benzoesowy

Metoda oznaczania w powietrzu na stanowiskach pracy¹

Benzoic acid

Determination in workplace air

MAŁGORZATA SZEWCZYŃSKA

<http://orcid.org/0000-0003-3319-3024>

e-mail: mapol@ciop.pl

PAWEŁ WASILEWSKI

<http://orcid.org/0000-0001-6735-4207>

Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy

Central Institute for Labour Protection – National Research Institute, Warsaw, Poland

Numer CAS 65-85-0

Streszczenie

Kwas benzoesowy jest organicznym związkiem należącym do grupy aromatycznych kwasów karboksylowych. Wykorzystuje się go głównie do produkcji fenolu, kaprolaktamu i soli benzoesowych, jako konserwant spożywczy i farmaceutyczny oraz przy produkcji herbicydów, środków owadobójczych i bakteriobójczych. Zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE 1272/2008) kwas benzoesowy został sklasyfikowany jako substancja działająca szkodliwie na płuca, drażniąca skórę i powodująca uszkodzenie oczu. Celem badań było opracowanie metody oznaczania kwasu benzoesowego do oceny narażenia zawodowego w zakresie $1/10 \div 2$ zaproponowanej wartości NDS. Metoda polega na pobraniu frakcji wdychalnej kwasu benzoesowego zawartej w powietrzu na filtr z włókna szklanego pokryty węglanem(IV) sodu, desorpcji roztworem metanolu w wodzie, a następnie oznaczeniu zawartości kwasu benzoesowego w próbce z zastosowaniem chromatografii cieczowej z detektorem diodowym (UHPLC-DAD). Podczas wykonywania badań spełniono wymagania walidacyjne przedstawione w normie europejskiej PN-EN 482. Metoda umożliwia oznaczanie kwasu benzoesowego w powietrzu w stężeniach $0,05 \div 1 \text{ mg/m}^3$. Zakres tematyczny artykułu obejmuje zagadnienia zdrowia oraz bezpieczeństwa i higieny środowiska pracy będące przedmiotem badań z zakresu nauk o zdrowiu oraz inżynierii środowiska.

Słowa kluczowe: kwas benzoesowy, chromatografia cieczowa, narażenie zawodowe, powietrze na stanowiskach pracy, nauki o zdrowiu, inżynieria środowiska.

¹ Opracowano i wydano na podstawie wyników V etapu programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, finansowanego w zakresie zadań służb państwowych ze środków ministra właściwego ds. pracy. Zadanie nr 1.SP.02 pt.: „Opracowanie metod oznaczania 9 szkodliwych substancji chemicznych dla potrzeb oceny środowiska pracy”.

Koordinator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy

Abstract

Benzoic acid is an organic compound that belongs to the group of aromatic carboxylic acids. It is mainly used in the production of phenol, caprolactam and benzoic salts, as a food and pharmaceutical preservative, and in the production of herbicides, insecticides and bactericides. According to the Regulation of the European Parliament and of the Council (WE 1272/2008), benzoic acid is classified as a substance that is harmful to the lungs, irritates the skin and causes eye damage. The aim of the study was to develop a method for the determination of benzoic acid for the assessment of occupational exposure within 1/10–2 of the proposed MAC value. The method involves taking the inhalable fraction of airborne benzoic acid onto a glass fiber filter coated with sodium carbonate(IV), desorption with a solution of methanol in water and then determining the benzoic acid content of the sample by the use of liquid chromatography with diode array detector (UHPLC-DAD). Validation requirements presented in European standard PN-EN 482 were fulfilled during the tests. The method enables determination of benzoic acid in air at concentrations of 0.05 to 1 mg/m³. The method for determining benzoic acid has been recorded in the form of an analytical procedure (see Appendix). This article discusses the problems of occupational safety and health, which are covered by health sciences and environmental engineering.

Keywords: benzoic acid, liquid chromatography, occupational exposure, air at workplaces, health sciences, environmental engineering.

WPROWADZENIE

Właściwości i zastosowanie

Kwas benzoesowy (numer CAS: 65-85-0) występuje w formie białych drobnych kryształów, które są słabo rozpuszczalne w wodzie. W czasie ogrzewania łatwo sublimuje (entalpia sublimacji ok. 90 kJ/mol). W naturze kwas ten występuje w korze czereśni i strączyńca, a także w malinach i anyżu. W postaci anionu benzoesowego występuje w znacznych ilościach (które mogą przekraczać 0,1%) w żurawinie, grzybach, cynamonie oraz niektórych produktach mlecznych (efekt fermentacji bakteryjnej). Kwas benzoesowy nie jest substancją lotną, ma lekko wyczuwalny zapach przypalonych migdałów, a w smaku jest lekko gorzki. Jest to związek organiczny, który jest najprostszym możliwym aromatycznym kwasem karboksylowym o grupie karboksylowej połączonej bezpośrednim wiązaniem z pierścieniem aromatycznym benzenu. Kwas benzoesowy występuje w wielu roślinach jako substancja pośrednia podczas biosyntezy metabolitów (ChemPył 2022; GESTIS 2022; PubChem 2022). Ogólną charakterystykę i podstawowe właściwości fizykochemiczne kwasu benzoesowego przedstawiono w tabeli 1.

Kwas benzoesowy jest wykorzystywany jako konserwant spożywczy i farmaceutyczny, przy produkcji fenolu, kaprolaktamu i soli benzoesowych oraz do produkcji insektycydów, herbicydów, fungicydów i bakteriocydów. Wykorzystuje się go

również jako środek do suszenia tytoniu i barwnik. Do produkcji kwasu benzoesowego stosuje się najczęściej dwie metody: oksydacja toluenu molekularnym tlenem w fazie ciekłej z wykorzystaniem kobaltu jako katalizatora oraz dekarboksylacja bezwodnika ftalowego w obecności katalizatora (PubChem 2022). Kwas benzoesowy jest produkowany w Europejskim Obszarze Gospodarczym i/lub przywożony do niego w ilości $\geq 100\ 000$ ÷ $< 1\ 000\ 000$ ton rocznie (ECHA 2022).

W państwach Unii Europejskiej kwas benzoesowy sklasyfikowano jako substancję działającą toksycznie na płuca poprzez kontakt drogą wziewną (kat. 1), powodującą podrażnienie skóry (kat. 2) i powodującą uszkodzenie oczu (kat. 1). Substancji tej przypisano następujące zwroty określające rodzaj zagrożenia (WE 1272/2008):

- H372: powoduje uszkodzenie płuc poprzez długotrwałe lub powtarzane narażenie drogą wziewną
- H315: działa drażniąco na skórę
- H318: powoduje poważne uszkodzenie oczu.

Do tej pory w Polsce nie było ustalonej wartości normatywu higienicznego – najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) dla kwasu benzoesowego. W 2022 r. Zespół Ekspertów ds. Czynników Chemicznych działający przy Międzyresortowej Komisji do spraw Najwyższych Dopuszczalnych

Stężenie i Natężenie Czynniki Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy zaproponował wartości normatywów higienicznych dla kwasu benzoesowego (frakcja wdychalna): NDS – 0,5 mg/m³, NDSch (najwyższe dopuszczalne stężenie chwilowe) – 1,5 mg/m³.

W dostępnej literaturze (Halvorson 1984) jest przedstawiona jedna metoda oznaczania kwasu benzoesowego w powietrzu. Polega ona na zaadsorbowaniu kwasu benzoesowego na rurce wypełnionej złożem Poropak Q, a następnie na desorpcji termicznej w temperaturze 240°C i analizie chromatograficznej z detekcją płomieniowo-jonizacyjną. Metoda zakłada pobranie próbki powietrza o objętości 8 ÷ 24 l. Granica oznaczenia ilościowego (LOQ) przedstawionej metody wynosi 10 µg kwasu benzoesowego dla próbki powietrza 20 l (0,5 µg/l).

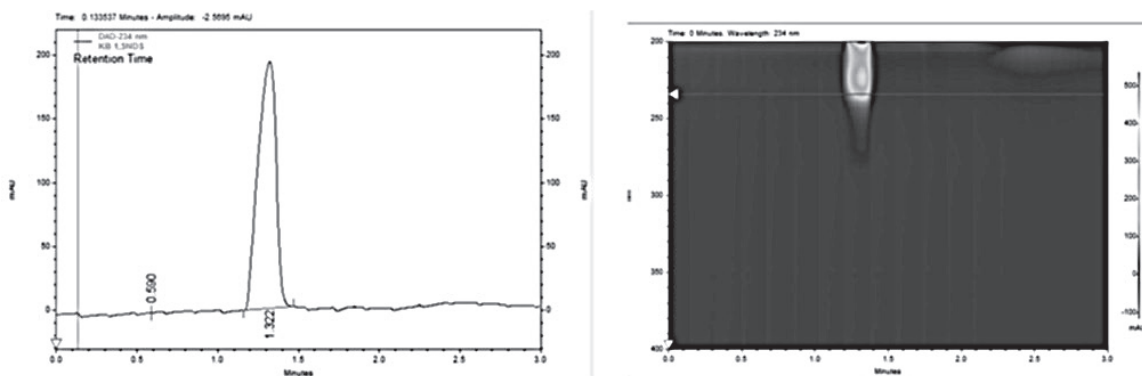
Ze względu na brak w dostępnej literaturze innych metod oznaczania kwasu benzoesowego w powietrzu dokonano przeglądu literatury pod kątem wykorzystania innych technik analitycznych do oznaczania kwasu benzoesowego.

W publikacji Burana-osot i in. (2014) przedstawiono prostą, czułą i specyficzną metodę oznaczania kwasu benzoesowego techniką chromatografii cieczowej, którą zwalidowano do jednoczesnego oznaczania kwasu benzoesowego i kwasu sorbowego w makaronach. Do ekstrakcji kwasów z próbki zastosowano mieszaninę metanolu i wody (60/40, v/v). Rozdział analitów uzyskano na modyfikowanej kolumnie krzemionkowej Germini-C18 (50 mm × 4,6 mm i.d., średnica cząstek 5 µm). Faza ruchoma składała się z 0,05 M octanu amonu (pH 4,4) i metanolu zmieszanych w stosunku 60: 40 (% v/v) przy prędkości przepływu 1 ml/min. Długość fali analitycznej detektora diodowego wynosiła 234 nm. Krzywa kalibracyjna dla kwasu benzoesowego i kwasu sorbowego była liniowa w zakresie stężeń odpowiednio 5 ÷ 200 µg/ml (r^2 0,9998) i 1 ÷ 50 µg/ml (r^2 0,9998). Wartości granicy wykrywalności (LOD) i granicy oznaczenia ilościowego (LOQ) wynosiły odpowiednio 0,42 i 1,14 µg/ml oraz 0,32 i 0,99 µg/ml dla kwasu benzoesowego i kwasu sorbowego.

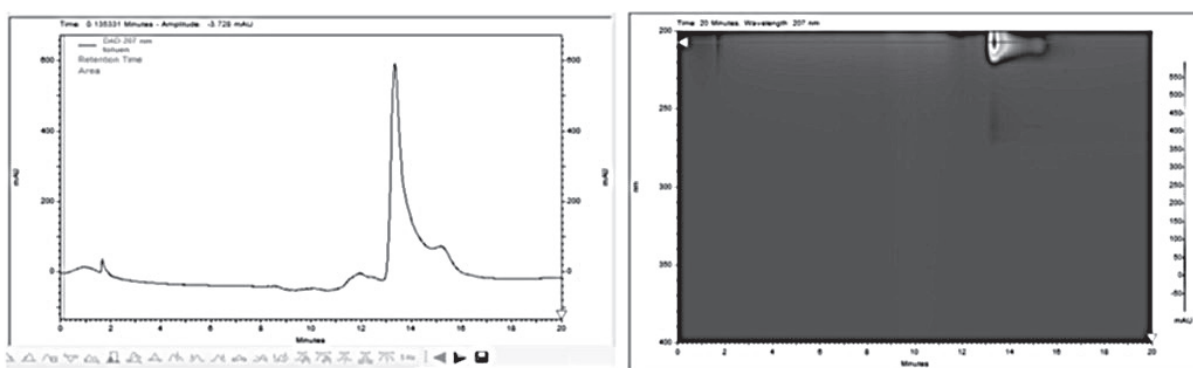
Tabela 1. Ogólna charakterystyka i właściwości fizykochemiczne kwasu benzoesowego

Table 1. General characteristic and physico-chemical properties of benzoic acid

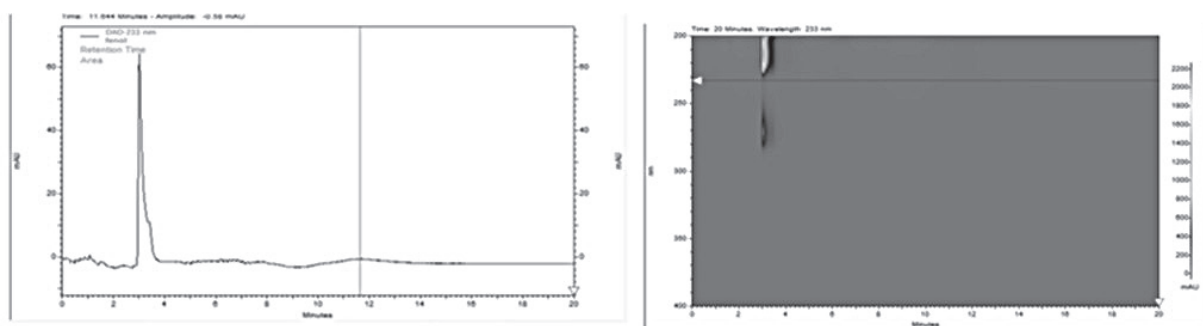
Parametr	Właściwości substancji
Nomenklatura systematyczna (IUPAC)	kwas benzoesowy kwas benzenokarboksylowy
Inne nazwy i oznaczenia	łac. <i>acidum benzoicum</i> E210, kwas fenylkarboksylowy
Numer CAS	65-85-0
Wzór sumaryczny	C ₇ H ₆ O ₂
Inne wzory	C ₆ H ₅ COOH, PhCOOH
Masa molowa	122,12 g/mol
Postać	kryształy w kształcie płatków lub igieł bądź sypki proszek o lekko gorzkim smaku
Gęstość	1,2659 g/cm ³ (15°C); ciało stałe
Rozpuszczalność w wodzie	2,09 g/kg (10°C) 3,44 g/kg (25°C) 8,49 g/kg (50°C)
Rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych	rozpuszczalny w acetonie, benzenie, chloroformie, dobrze w etanolu i eterze dietylowym
Temperatura topnienia	122,340°C
Temperatura wrzenia	250,2°C
Temperatura zapłonu	121°C (zamknięty tygiel)
Temperatura samozapłonu	570°C
Współczynnik logP	1,88
Kwasowość (pK _a)	4,204
Współczynnik załamania	1,504 (589 nm, 132°C)



A) Chromatogram i widmo kwasu benzoesowego przy $\lambda = 234$, czas retencji 1,32 min



B) Chromatogram i widmo toluenu przy $\lambda = 207$, czas retencji 13,5 min



C) Chromatogram i widmo fenolu przy $\lambda = 233$ nm, czas retencji 3,0 min

Rycina 1. Chromatogramy i widma roztworu wzorcowego kwasu benzoesowego (A), toluenu (B), fenolu (C) w mieszaninie metanol/woda. HPLC-DAD, kolumna ULTRA C18

Figure 1. Chromatograms and spectra of a standard solution of benzoic acid (A), toluene (B), phenol (C) in a methanol/water mixture. HPLC-DAD, ULTRA C18 column

Badanie warunków pobierania próbek powietrza i wstępne badania ekstrakcji kwasu benzooesowego

W celu ilościowego wyodrębnienia frakcji wdechowej kwasu benzooesowego z powietrza do badań wykorzystano: filtry z włókna szklanego Vitro-Disk, filtry celulozowe MCE oraz filtry z włókna szklanego Vitro-Disk i celulozowe MCE pokryte węglanem(IV) sodu o stężeniu 1 mol/l.

Wstępne badania ekstrakcji kwasu benzooesowego z filtrów z włókna szklanego przeprowadzono stosując mieszaninę metanolu i wody (60/40 v/v). Na trzy serie po sześć filtrów naniesiono po: 12,5; 25 i 50 μ l roztworu kwasu benzooesowego w mieszaninie metanol/woda (60/40) o stężeniu 14,4 mg/ml. Następnie filtry z nakropionym w ilości 12,5 μ l kwasem benzooesowym pozostawiano do wyschnięcia i od razu ekstrahowano 10 ml mieszaniny metanol/woda (60/40). Roztwory uzyskane po ekstrakcji kwasu benzooesowego z filtrów poddano analizie chromatograficznej. Wyniki oznaczeń porównywano z wynikami oznaczeń kwasu benzooesowego w roztworach o tych samych stężeniach przygotowanych w mieszaninie metanol/woda. Współczynnik ekstrakcji kwasu benzooesowego z filtrów z włókna szklanego wyniósł 93%. Filtry z nakropionym w ilości 25 i 50 μ l kwasem benzooesowym pozostawiano do wyschnięcia w eksykatorze do następnego dnia. Po tym czasie kwas benzooesowy ekstrahowano i roztwory poddano analizie chromatograficznej. Wyniki oznaczeń porównywano z wynikami oznaczeń kwasu benzooesowego w roztworach o tych samych stężeniach przygotowanych w mieszaninie metanol/woda. Współczynnik ekstrakcji kwasu wyniósł 59 i 68%. Powtórzenie badania z zastosowaniem jako rozpuszczalnika do ekstrakcji samego metanolu dało podobne wartości współczynnika ekstrakcji.

Ze względu na uzyskane niskie wartości wydajności ekstrakcji kwasu z filtrów szklanych wykonano dodatkowe badania mające na celu określenie wydajności ekstrakcji w funkcji czasu, jaki upłynął od naniesienia tego związku na filtr. W tym celu na osiemnaście filtrów naniesiono po 12,5 μ l roztworu kwasu benzooesowego w mieszaninie metanol/woda (60/40) o stężeniu 14,4 mg/ml i pozostawiono je na 1, 3 i 6 h. Następnie filtry (po sześć filtrów dla każdego punktu czasowego) ekstrahowano 10 ml mieszaniny metanol/woda (60/40).

Roztwory uzyskane po ekstrakcji kwasu z filtrów poddano analizie chromatograficznej. Wykonano także oznaczanie kwasu w roztworach porównawczych sporządzonych w identyczny sposób, ale bez filtra. Wydajność ekstrakcji kwasu benzooesowego z filtrów szklanych po 6 h od momentu naniesienia zmniejszyła się o 21%. Przeprowadzone przy użyciu filtrów z włókna szklanego badania wydajności ekstrakcji z zastosowaniem różnych rozpuszczalników (metanol, metanol:woda 6: 4) dały wynik negatywny i z tego względu przeprowadzono badania z użyciem filtrów MCE.

Na sześć filtrów z mieszaniny estrów celulozowych (MCE) naniesiono po 10 μ l roztworu kwasu benzooesowego w mieszaninie metanol/woda (60/40) o stężeniu 14,4 mg/ml. Po wyschnięciu, tj. po ok. 2 h, filtry ekstrahowano 10 ml mieszaniny metanol/woda (60/40). Roztwory uzyskane po ekstrakcji kwasu benzooesowego z filtrów poddano analizie chromatograficznej. Wykonano także oznaczanie kwasu benzooesowego w roztworach porównawczych sporządzonych w identyczny sposób, ale bez filtra. Wyniki badania ekstrakcji z filtrów przedstawiono na rycinie 2.

Średnia wartość wydajności ekstrakcji kwasu benzooesowego z filtrów MCE wyniosła 91%.

Ponieważ wartość wydajności ekstrakcji z filtrów MCE była zadowalająca, wykonano badania określające retencję kwasu na filtrach MCE podczas przepuszczania powietrza. Podobnie jak poprzednio, zestawiono układ składający się z filtra MCE z naniesionym analitem w ilości odpowiadającej 0,018 i 0,036 mg (0,5 i 1 NDS) oraz z pompy o regulowanym i kontrolowanym za pomocą rotametu strumieniu objętości powietrza. Przez układ przepuszczano 240 i 720 l powietrza ze strumieniem objętości 120 l/h. Dla każdej objętości powietrza wykonano po trzy powtórzenia pochłaniania. Po przepuszczeniu powietrza przeprowadzono ekstrakcję kwasu benzooesowego przy użyciu 10 ml mieszaniny metanolu i wody (60/40, v/v). Tak uzyskane roztwory poddano analizie chromatograficznej w podanych wyżej warunkach. Wykonano także oznaczanie kwasu benzooesowego w roztworach porównawczych o stężeniach 0,018 i 0,036 mg/ml. Wydajność ekstrakcji KB z filtra MCE po przepuszczeniu powietrza przez 2 h była na poziomie $74 \div 77\%$, a w przypadku próbek, przez które przepuszczano powietrze przez 6 h, wyniosła $50 \div 55\%$.

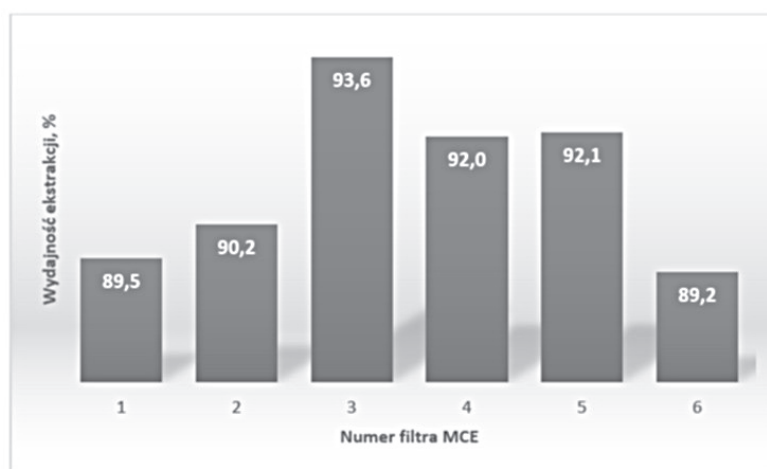
Ponieważ filtry z włókna szklanego i MCE nie zatrzymywały frakcji wdychalnej kwasu benzoowego, zdecydowano się na wykorzystanie metody zalecanej w normie ISO 21438-2 (2009) i wykorzystanej w publikacji Howe i in. (2011) do oznaczania HCl, w której w celu pobrania próbki powietrza do oznaczeń ilościowych znaną objętość badanego powietrza przepuszcza się przez próbnik zawierający filtr z włókna szklanego pokryty węglanem(IV) sodu.

Na filtry z włókna szklanego o średnicy 25 mm naniesiono po 340 μ l roztworu węglanu(IV) sodu

o stężeniu 1 mol/l i pozostawiono do wyschnięcia w eksykatorze.

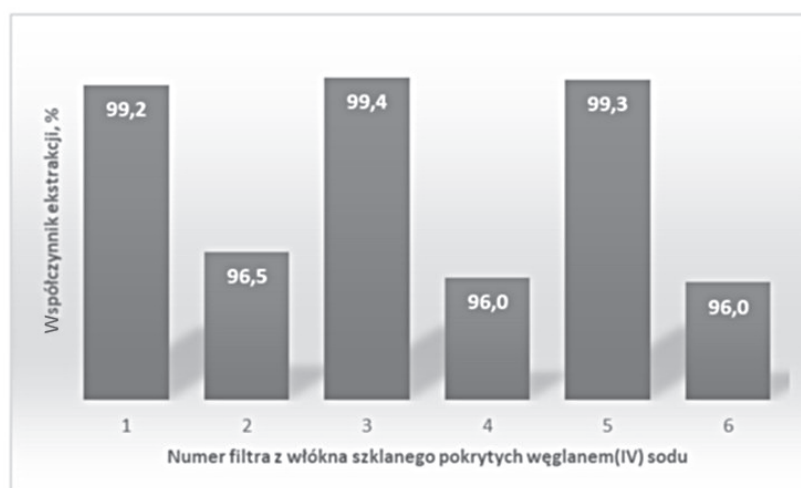
Badania przeprowadzono tylko z użyciem filtrów z włókna szklanego, ponieważ filtrów MCE nie udało się pokryć roztworem węglanu(IV) sodu.

Badanie wydajności ekstrakcji z filtrów z włókna szklanego pokrytych węglanem(IV) sodu przeprowadzono w identyczny sposób, jak opisano przy badaniach z użyciem filtrów MCE. Wyniki badania ekstrakcji kwasu benzoowego z filtrów z włókna szklanego przedstawiono na rycinie 3.



Rycina 2. Wartości wydajności ekstrakcji kwasu benzoowego z filtra celulozowego MCE. HPLC-DAD. Kolumna ULTRA C18, $\lambda = 234$ nm, dozowanie próbki 10 μ l

Figure 2. Benzoic acid recovery from cellulose filter MCE. HPLC-DAD. ULTRA C18 column, $\lambda = 234$ nm, sample dispensing 10 μ l



Rycina 3. Wydajność ekstrakcji kwasu benzoowego z filtra z włókna szklanego pokrytego węglanem(IV) sodu. HPLC-DAD. Kolumna ULTRA C18, $\lambda = 234$ nm, dozowanie próbki 10 μ l

Figure 3. Recovery of benzoic acid from glass fibre filter coated with sodium carbonate. HPLC-DAD. ULTRAC18 column, $\lambda = 234$ nm, sample dispensing 10 μ l

Średnia wydajność ekstrakcji kwasu benzoowego z filtra z włókna szklanego pokrytego węglanem(IV) sodu była na poziomie 98%.

Sprawdzenie pochłaniania przeprowadzono dla sześciu filtrów z włókna szklanego pokrytych węglanem(IV) sodu z analitem naniesionym w ilości odpowiadającej 0,018 mg/ml (0,5 NDS) i umieszczonym w oprawce IOM oraz pompy o regulowanym i kontrolowanym za pomocą rotametri strumieniu objętości powietrza. Kolejno przez trzy filtry przepuszczano 240 i 720 l powietrza ze strumieniem objętości 120 l/h. Po pobraniu próbek powietrza przeprowadzono ekstrakcję kwasu benzoowego przy użyciu 10 ml mieszaniny metanolu i wody (60/40, v/v). Tak uzyskane roztwory oraz roztwór kontrolny o stężeniu 0,018 mg/ml poddano analizie chromatograficznej. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 2.

Wartość wydajności ekstrakcji kwasu z filtra z włókna szklanego pokrytego węglanem(IV) sodu niezależnie od objętości przepuszczonego powietrza (240 lub 720 l) wyniosła ponad 96%.

Na podstawie uzyskanych wyników ustalono następujący sposób pobierania próbek powietrza zawierającego kwas benzoowy: przez filtr z włókna szklanego pokryty węglanem(IV) sodu o stężeniu 1 mol/l umieszczony w próbniku do pobierania frakcji wdychalnej należy przepuścić 720 l badanego powietrza ze strumieniem objętości 120 l/h. Pobrane próbki powietrza przechowywane w chłodziarce są trwałe przez 7 dni. Do ekstrakcji kwasu benzoowego z filtrów pokrytych węglanem(IV) sodu należy zastosować mieszalnię metanolu

i wody w stosunku objętościowym 60: 40 w ilości 10 ml i wytrząsanie filtrów przez 30 min.

Wyznaczanie parametrów kalibracyjnych metody

Zakres stężeń roztworów wzorcowych wynosi: $0,0036 \div 0,072$ mg/ml ($3,6 \div 72$ µg/ml). Stężenie tych wzorców ustalono na podstawie następujących założeń:

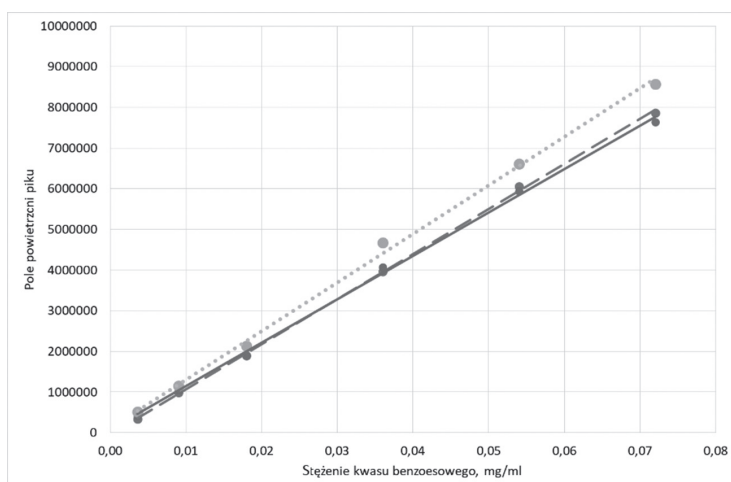
- zakres pomiarowy $0,05 \div 1$ mg/m³
- objętość powietrza pobranego do analizy 720 l
- objętość rozpuszczalnika 10 ml.

Przygotowano trzy serie roztworów kwasu benzoowego w wodnym roztworze metanolu o wzrastających stężeniach $0,0036 \div 0,072$ mg/ml. Do chromatografu wprowadzono po 10 µl roztworów wzorcowych. Dla każdego stężenia wykonano po dwa oznaczenia. Następnie odczytano powierzchnie pików i sporządzono wykres zależności powierzchni pików badanej substancji od jej stężenia w roztworach wzorcowych. Następnie sporządzono wykres zależności powierzchni pików od stężenia kwasu benzoowego w roztworach wzorcowych (ryc. 4). Parametry krzywych kalibracji przedstawiono w tabeli 3. Średni współczynnik korelacji wyniósł 0,999, a współczynnik zmienności współczynnika kalibracji 3,18%.

Tabela 2. Wyniki badania wydajności ekstrakcji kwasu benzoowego z filtrów z włókna szklanego pokrytych węglanem(IV) sodu. HPLC-DAD. Kolumna ULTRA C18, $\lambda = 234$ nm, dozowanie próbki 10 µl

Table 2. Results of benzoic acid recovery from sodium carbonate-coated glass fibre filters. HPLC-DAD. ULTRA C18 column, $\lambda = 234$ nm, sample dispensing 10 µl

Rodzaj filtra	Strumień objętości pochłanianego powietrza, l/h	Czas pochłaniania, h	Przybliżone stężenie substancji w powietrzu, mg/m ³	Średnia powierzchnia pików substancji w roztworach ekstraktów z filtra $n = 2$	Wydajność ekstrakcji z filtra po przepuszczeniu powietrza, %
Filtr z włókna szklanego pokryty węglanem(IV) sodu	120	2	0,25	1 694 404	96,1
				1 709 149	96,9
	6		1 691 663	95,9	
			1 721 773	97,6	
Roztwór kontrolny 0,018 mg/ml (0,25 mg/m ³)				1 691 465	95,9
				1 699 430	96,4
				Średnia powierzchnia 1 763 411	



Rycina 4. Wykres zależności powierzchni pików kwasu benzoowego od jego stężeń w roztworach wzorcowych. HPLC-DAD. Kolumna ULTRA C18, $\lambda = 234$ nm

Figure 4. Plot of the dependence of the peak area of benzoic acid on its concentrations in standard solutions. HPLC-DAD. ULTRA C18 column, $\lambda = 234$ nm

Tabela 3. Parametry krzywych kalibracji

Table 3. Parameters for calibration curves

Parametr	Seria I	Seria II	Seria III	Średnia
Krzywa kalibracji $y = bx + a$	$y = 110\,887\,042,26x - 39\,151,31$	$y = 106\,858\,858,57x + 72\,510,31$	$y = 119\,436\,704,75x + 109\,607,61$	$y = 112\,394\,201,79x + 47\,655,54$
Współczynnik korelacji r	0,9997	0,9993	0,9989	0,9995
Średnia wartość współczynnika kalibracji				115 036 937,8
Odczylenie standardowe współczynnika kalibracji, S_b				3 652 581,96
Współczynnik zmienności współczynnika kalibracji, n_{kal} %				3,18

Precyzja

W celu oceny precyzji oznaczeń kalibracyjnych sporządzono trzy serie po osiem roztworów roboczych kwasu benzoowego o stężeniach: 0,018; 0,036 i 0,054 mg/ml, które poddano analizie chromatograficznej.

Współczynniki zmienności dla kolejnych poziomów stężenia wynoszą odpowiednio: 1,64; 0,73 i 1,22%.

Wyznaczenie wydajności ekstrakcji kwasu benzoowego z filtrów z włókna szklanego pokrytych węglanem(IV) sodu

Badania stopnia wydajności ekstrakcji przeprowadzono z użyciem filtrów z włókna szklanego pokrytych węglanem(IV) sodu. Do wymywania

osadzonego na filtrze kwasu stosowano wodny roztwór metanolu. W celu określenia wydajności ekstrakcji kwasu z filtrów przeprowadzono następujące badania: na trzy serie po sześć filtrów z włókna szklanego z naniesionym węglanem(IV) sodu nakropiono po 10, 25 i 50 μ l roztworu kwasu benzoowego o stężeniu 14,4 mg/ml. Filtry pozostawiono na 2 h do wyschnięcia. Następnie filtry ekstrahowano 10 ml mieszaniny metanol/woda (60/40, v/v). Po 30-minutowym wytrząsaniu ekstrakt przesączono przez filtry strzykawkowe do fiolek analitycznych i oznaczono chromatograficznie. Wykonano także oznaczanie kwasu benzoowego w roztworach porównawczych o stężeniach identycznych jak badane ekstrakty (tab. 4). Średnia wydajność ekstrakcji dla trzech poziomów stężeń wynosi 98%.

Tabela 4. Wyniki badania wydajność ekstrakcji dla kwasu benzoowego
Table 4. Results of the extraction efficiency test for benzoic acid

Powierzchnia pików z roztworów po desorpcji wg wskazań analitycznej stacji komputerowej		Średnia powierzchnia pików z roztworów po desorpcji P_i	Średnia powierzchnia pików z roztworów porównawczych P_o	Wydajność ekstrakcji, % d_i	Średnia wydajność ekstrakcji, % d_{sr}
0,014 mg – kwas benzoowy					
1	1 613 061,0	1 612 964,50	1 650 930,70	98	98
	1 612 868,0				
2	1 596 960,0	1 596 324,00		97	
	1 595 688,0				
3	1 613 596,0	1 617 749,50		98	
	1 621 903,0				
4	1 637 089,0	1 636 755,00		99	
	1 636 421,0				
5	1 626 073,0	1 640 769,00		99	
	1 655 465,0				
6	1 549 492,0	1 558 529,00		94	
	1 567 566,0				
Średnia powierzchnia pików					1 610 515,2
Odchylenie standardowe S					29 791,8
Współczynnik zmienności n , %					1,85
0,036 mg – kwas benzoowy					
1	4 043 638	4 047 070,50	4 148 064,67	98	97
	4 050 503				
2	3 996 047	3 993 123,50		96	
	3 990 200				
3	3 987 605	3 993 746,50		96	
	3 999 888				
4	3 993 908	3 997 550,00		96	
	4 001 192				
5	4 011 493	4 015 254,00		97	
	4 019 015				
6	3 982 359	4 006 097,00		97	
	4 029 835				
Średnia powierzchnia pików					4 008 806,9
Odchylenie standardowe S					22 407,2
Współczynnik zmienności n , %					0,56
0,072 mg – kwas benzoowy					
1	7 911 671,0	7 946 576,5	8 071 102	98	98
	7 981 482,0				
2	8 019 433,0	8 022 050,0		99	
	8 024 667,0				
3	7 914 385,0	7 914 859,5		98	
	7 915 334,0				
4	7 920 869,0	7 925 634,5		98	
	7 930 400,0				
5	7 914 338,0	7 915 723,5		98	
	7 917 109,0				
6	7 912 271,0	7 907 360,0		98	
	7 902 449,0				
Średnia powierzchnia pików					7 938 700,7
Odchylenie standardowe S					43 761,1
Współczynnik zmienności n , %					0,55

Badanie trwałości roztworów i próbek kwasu benzoesowego

W celu sprawdzenia trwałości roztworów wzorcowych przygotowano roztwór kwasu benzoesowego w mieszaninie metanol/woda (60/40) o stężeniu 0,072 mg/ml. Stężenie kwasu benzoesowego w tak przygotowanym roztworze oznaczano bezpośrednio po przygotowaniu oraz po 2, 3 i 6 dniach przechowywania w chłodziarce. Po 6 dniach przechowywania w chłodziarce różnica w powierzchniach pików kwasu benzoesowego w stosunku do próbek badanych bezpośrednio po przygotowaniu wynosiła 3,2%. Można więc uznać, że roztwory przechowywane w chłodziarce są trwałe przez 6 dni.

W celu sprawdzenia trwałości próbek kwasu benzoesowego naniesionego na filtry z włókna szklanego pokryte węglanem(IV) sodu wykonano badania w następujący sposób: na dwanaście filtrów z włókna szklanego pokrytych węglanem(IV) sodu naniesiono po 10 µl roztworu kwasu benzoesowego w mieszaninie metanol/woda (60/40) o stężeniu 14,4 mg/ml. Po wysuszeniu trzy filtry przeniesiono oddzielnie do kolb stożkowych, dodano 10 ml mieszaniny metanol/woda (60/40, v/v) i po 30 min wytrząsania analizowano chromatograficznie. Pozostałe filtry z naniesionym kwasem przechowywano w chłodziarce do czasu przeprowadzenia analiz. Badanie kolejnych filtrów

($n = 3$) przeprowadzono po 1, 4 i 7 dniach przechowywania. Po 7 dniach przechowywania w chłodziarce różnica w powierzchniach pików kwasu benzoesowego w stosunku do próbek badanych bezpośrednio po przygotowaniu wynosiła 1%. Można więc uznać, że próbki przechowywane w chłodziarce są trwałe przez co najmniej 7 dni (tab. 5).

Walidacja metody

Walidację metody przeprowadzono wg wytycznych normy europejskiej PN-EN 482. Granicę wykrywalności oraz granicę oznaczalności wyznaczono na podstawie wartości odchylenia standardowego zbioru sygnałów ślepych prób i kąta nachylenia krzywej kalibracji.

W wyniku przeprowadzonej walidacji metody uzyskano następujące dane:

- zakres pomiarowy 0,5 ÷ 1 mg/m³
- ilość pobranego powietrza 720 l
- zakres krzywej wzorcowej 0,0036 ÷ 0,072 mg/ml
- granica wykrywalności 0,14 ng/ml
- granica oznaczalności 0,42 ng/ml
- całkowita precyzja badania 5,15%
- względna niepewność całkowita 11%
- niepewność rozszerzona 23%.

Tabela 5. Wyniki badania trwałości próbek kwasu benzoesowego na filtrach z włókna szklanego pokrytych węglanem(IV) sodu przechowywanych w chłodziarce. HPLC-DAD. Kolumna ULTRA C18, $\lambda = 234$ nm

Table 5. Results of a shelf life study of benzoic acid samples on glass fibre filters coated with sodium carbonate stored in a refrigerator. HPLC-DAD. ULTRA C18 column, $\lambda = 234$ nm

Zas przechowywania filtrów, liczba dni	Średnie pola powierzchni pików	Średnia	Różnica w powierzchniach pików kwasu benzoesowego w stosunku do badania od razu po przygotowaniu filtrów, %	Odchylenie standardowe	RDS
0	1705 053,5	1709 156	0	21 154,90424	1,24
	1732 061				
	1690 352				
1	1727 387	1698 748	0,6	24 802,63404	1,46
	1684 498				
	1684 357,5				
4	1676 483,5	1663 845	2,7	13 722,7398	0,82
	1649 248,5				
	1665 804				
7	1714 457,5	1692 407	1,0	19 113,8	1,13
	1680 563,5				
	1682 200				

PODSUMOWANIE

W wyniku przeprowadzonych badań opracowano metodę oznaczania kwasu benzooesowego w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem diodowym.

Ustalono sposób pobierania próbek powietrza:

- filtry z włókna szklanego pokryte węglanem(IV) sodu zapewniają ilościowe wyodrębnienie kwasu benzooesowego z badanego powietrza
- roztwory przechowywane w chłodziarce są trwałe przez co najmniej 6 dni
- optymalne warunki ekstrakcji zapewniające wydajność ekstrakcji na poziomie 98% uzyskano przy zastosowaniu mieszaniny metanol/woda (60/40, v/v), (10 ml) i 30 min wytrząsania.

Dobrano parametry chromatograficznego oznaczania:

- do oznaczania wytypowano kolumnę ULTRA C18 o długości 150 mm
- skład fazy ruchomej: metanol/woda 60/40, v/v
- długość fali analitycznej detektora diodowego do oznaczania kwasu benzooesowego $\lambda = 234 \text{ nm}$.

Wyznaczono parametry walidacyjne:

- zakres pomiarowy metody wynosi $1/10 \div 2$ wartości NDS zgodnie z PN-EN 482
- uzyskane krzywe kalibracyjne charakteryzują się wysoką wartością współczynnika korelacji ($r = 0,999$), który świadczy o liniowości wskazań detektora chromatografu cieczowego względem analizowanych stężeń kwasu benzooesowego
- wyznaczono granice wykrywalności i oznaczalności, wydajność ekstrakcji kwasu benzooesowego z filtrów na trzech poziomach stężeń, całkowitą precyzję, względną niepewność całkowitą i rozszerzoną metodą
- walidacja metody potwierdziła jej przydatność do zamierzonego zastosowania.

Opracowana metoda umożliwia oznaczanie kwasu benzooesowego na poziomie $1/10$ wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia i może być wykorzystana do oceny narażenia zawodowego.

Opracowaną metodę oznaczania kwasu benzooesowego w formie procedury analitycznej zamieszczono w załączniku.

PIŚMIENNICTWO

Burana-osot J., Arunsingharat L., Naksuk M. i in. (2014). Validation of a HPLC method for the determination of benzoic acid and sorbic acid in noodles. *Chiang Mai J. Sci.* 41(2), 370–382.

ChemPył (2022). Baza wiedzy o zagrożeniach chemicznych i pyłowych. CIOP-PIB, Warszawa.

ECHA (2022). Benzoic acid, <https://echa.europa.eu/pl/substance-information/-/substanceinfo/100.000.562> [dostęp: 07.10.2022 r.].

GESTIS (2022). GESTIS Substance database. BG Institute for Occupational Safety and Health, Sankt Augustin, Germany.

Halvorson D.O. (1984). Determination of benzoic acid in air. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 45(10), 727–730.

Howe A., Musgrove D., Breuer D. i in. (2011). Evaluation of sampling methods for measuring exposure to volatile inor-

ganic acids in workplace air: Part 1. Sampling hydrochloric acid (HCl) and nitric acid (HNO₃) from a test gas atmosphere. *J. Occup. Environ. Hyg.* 8(8), 492–502.

ISO 21438-2:2009 Workplace atmospheres – Determination of inorganic acids by ion chromatography – Part 2: Volatile acids, except hydrofluoric acid (hydrochloric acid, hydrobromic acid and nitric acid)

PN-EN 482+A1:2021 Narażenie na stanowiskach pracy – Wymagania ogólne dotyczące charakterystyki procedur pomiarów czynników chemicznych [Workplace exposure – General requirements for the performance of procedures for the measurement of chemical agents].

PN-Z-04008-7:2002/Az1:2004 Ochrona czystości powietrza – Pobieranie próbek – Zasady pobierania próbek powietrza na stanowiskach pracy i interpretacji wyników.

PubChem (2022). National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 243, Benzoic acid. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzoic-acid> [dostęp: 7.10.2022 r.].

Rozporządzenie Komisji (UE) 2018/669 z dnia 16 kwietnia 2018 r. zmieniające, w celu dostosowania do postępu naukowo-technicznego, rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin. Dz. Urz. UE L 115/1 z 4.05.2018 r. [Commission Regulation (EU) 2018/669 of 16 April 2018 amending, for the purposes of its adaptation to technical and scientific progress, Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council on classification, labelling and packaging of substances and mixtures].

PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA KWASU BENZOESOWEGO W POWIETRZU NA STANOWISKACH PRACY

1. Zakres procedury

W niniejszej procedurze podano metodę oznaczania kwasu benzoesowego (numer CAS: 65-85-0) w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją diodową. Metodę stosuje się podczas kontroli warunków sanitarnohigienicznych.

Najmniejsze stężenie kwasu benzoesowego, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w procedurze, wynosi $0,05 \text{ mg/m}^3$ (dla próbki powietrza o objętości 720 l).

2. Powołania normatywne

Do stosowania niniejszego dokumentu są niezbędne podane niżej dokumenty, które w całości lub w części zostały w nim normatywnie powołane. W przypadku powołań datowanych ma zastosowanie wyłącznie wydanie cytowane. W przypadku powołań niedatowanych stosuje się ostatnie wydanie dokumentu powołanego (łącznie ze zmianami).

PN-Z-04008-7 Ochrona czystości powietrza – Pobieranie próbek – Zasady pobierania próbek powietrza w środowisku pracy i interpretacji wyników.

3. Zasada metody

Metoda polega na zatrzymaniu obecnego w badanym powietrzu kwasu benzoesowego na filtrze z włókna szklanego z naniesionym węglanem(IV) sodu, wymyciu zatrzymanej substancji roztworem wodnym metanolu i analizie chromatograficznej tak uzyskanego roztworu.

4. Postanowienia ogólne

4.1. Dokładność ważenia

O ile nie zaznaczono inaczej, substancje stosowane w analizie należy ważyć z dokładnością do 0,0002 g.

4.2. Postępowanie z substancjami niebezpiecznymi

Czynności związane z substancjami niebezpiecznymi należy wykonywać pod sprawnie działającym wyciągiem laboratoryjnym.

Zużyte substancje i roztwory należy gromadzić w przeznaczonych do tego celu pojemnikach i przekazywać do zakładów zajmujących się ich utylizacją.

5. Odczynniki, roztwory i materiały

O ile nie zaznaczono inaczej, do analizy należy stosować substancje o stopniu czystości co najmniej cz.d.a.

5.1. Kwas benzoesowy

5.2. Metanol o czystości do HPLC

5.3. Węglan(IV) sodu

Stosować węglan(IV) sodu bezwodny $\geq 99,5\%$.

5.4. Roztwór węglanu (IV) sodu do impregnowania filtrów z włókna szklanego

Stosować roztwór węglanu (IV) sodu o stężeniu 1 mol/l do impregnowania filtrów z włókna szklanego przygotowany w następujący sposób: 10,6 g bezwodnego węglanu sodu wg punktu 5.3 rozpuścić w 100 ml wody dejonizowanej.

5.5. Wodny roztwór metanolu do ekstrakcji oraz przygotowywania roztworów i fazy ruchomej

Stosować wodny roztwór metanolu o składzie objętościowym metanol: woda 60: 40.

5.6. Roztwór wzorcowy podstawowy kwasu benzoesowego

Do zważonej kolby miarowej o pojemności 100 ml odważyć około 7,2 mg kwasu benzoesowego, uzupełnić do kreski roztworem wg punktu 5.5 i dokładnie wymieszać. Stężenie kwasu benzoesowego w tak przygotowanym roztworze wynosi około 0,072 mg/ml. Obliczyć dokładne stężenie roztworu.

Roztwór przechowywany w chłodziarce zachowuje trwałość co najmniej 6 dni.

5.7. Roztwory wzorcowe robocze kwasu benzooesowego

Do sześciu kolb miarowych o pojemności 10 ml odmierzyć kolejno: 0,5; 1,25; 2,5; 5,0 i 7,5 ml roztworu wzorcowego podstawowego wg punktu 5.6, uzupełnić do kreski roztworem wg punktu 5.5 i wymieszać. Szóstym roztworem kalibracyjnym jest roztwór podstawowy wg punktu 5.6. Stężenie w tak przygotowanych roztworach wynosi odpowiednio: 0,0036; 0,009; 0,018; 0,036; 0,054 i 0,072 mg/ml.

Roztwory przechowywane w chłodziarce zachowują trwałość co najmniej 6 dni.

5.8. Roztwór wzorcowy kwasu benzooesowego do badania wydajności ekstrakcji

Do zważonej kolby miarowej o pojemności 10 ml odważyć około 140 mg kwasu benzooesowego, uzupełnić do kreski wodnym roztworem metanolu wg punktu 5.5 i dokładnie wymieszać. Stężenie kwasu benzooesowego w tak przygotowanym roztworze wynosi około 14 mg/ml. Obliczyć dokładne stężenie roztworu.

Roztwór przechowywany w chłodziarce zachowuje trwałość co najmniej 6 dni.

5.9. Filtry

Filtry z włókna szklanego o średnicy 25 mm.

5.10. Filtry do pobierania próbek

Na filtry wg punktu 5.9 nanieść po 340 μ l roztworu węglanu(IV) sodu wg punktu 5.4 i pozostawić do wyschnięcia w eksykatorze. Suche filtry przechowywać w szczelnie zamkniętym naczyniu.

5.11. Oprawki do filtrów

Oprawki do filtrów o średnicy 25 mm umożliwiające pobranie frakcji wdychalnej.

5.12. Filtry strzykawkowe

Stosować filtry strzykawkowe teflonowe o średnicy porów 0,45 μ m i średnicy 25 mm.

5.13. Kolby stożkowe

Kolby stożkowe Erlenmeyera o pojemności 25 ml, wyposażone w korki.

5.14. Strzykawki

Strzykawki do cieczy o pojemności 5 μ l ÷ 2,5 ml.

6. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

Stosować typowy sprzęt laboratoryjny oraz następujący:

6.1. Wysokosprawny chromatograf cieczowy

Wysokosprawny chromatograf cieczowy z detektorem diodowym.

6.2. Kolumna chromatograficzna

Kolumna chromatograficzna umożliwiająca oznaczanie kwasu benzooesowego w obecności innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu, np. kolumna wypełniona żelem krzemionkowym z łańcuchami alkilowymi zawierającymi 18 atomów węgla, długości 150 cm i średnicy wewnętrznej 4,6 mm i uziarnieniu 5 μ m (np. ULTRA C18).

6.3. Pompa ssąca

Pompa ssąca umożliwiająca pobieranie próbek powietrza ze stałym strumieniem objętości wg rozdziału 7.

7. Pobieranie próbek powietrza

Próbki powietrza należy pobierać wg normy PN-Z-04008-7. W miejscu pobierania próbek przez filtr wg punktu 5.10 umieszczony w oprawce wg punktu 5.11 przepuścić do 720 l badanego powietrza ze stałym strumieniem objętości 2 l/min przy użyciu pompy wg punktu 6.3.

Pobrane próbki przechowywane w chłodziarce są trwałe przez 7 dni.

8. Warunki pracy chromatografu

Warunki pracy chromatografu należy dobrać tak, aby uzyskać rozdzielenie kwasu benzooesowego od innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu. W przypadku stosowania kolumny o parametrach wg punktu 6.2 przykładowe warunki oznaczania są następujące:

- kolumna 150 mm \times 4,6 mm;
 $d_p = 5 \mu$ m
- faza ruchoma:
metanol/woda 60/40 (v/v)
- strumień objętości fazy
ruchomej 1 ml/min
- temperatura kolumny temperatura
otoczenia
- długość fali analitycznej
detektora $\lambda = 234$ nm
- dozowanie próbki 10 μ l.

9. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Do chromatografu wprowadzić po 10 μ l roztworów wzorcowych roboczych kwasu benzooesowego wg punktu 5.7. Z każdego roztworu wzorcowego należy wykonać dwukrotny pomiar. Odczytać

powierzchnie pików wg wskazań integratora i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami a wartością średnią nie powinna być większa niż 5% wartości średniej. Następnie wykreślić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych stężenie kwasu benzoesowego, w miligramach na mililitr, a na osi rzędnych – odpowiadające im średnie powierzchnie pików.

Dopuszcza się automatyczne integrowanie danych i sporządzanie krzywej wzorcowej.

10. Wykonanie oznaczania

Po pobraniu próbki powietrza wg rozdziału 7 z oprawki wg punktu 5.11 przenieść filtr do kolby stożkowej wg punktu 5.13 i dodać 10 ml wodnego roztworu metanolu o składzie objętościowym metanol: woda 60: 40 wg punktu 5.5. W przypadku analizy próbek chwilowych (15-minutowych) do ekstrakcji użyć 5 ml wodnego roztworu metanolu o składzie objętościowym metanol: woda 60: 40 wg punktu 5.5. Jednocześnie w celu sporządzenia roztworu próbki ślepej postępować w identyczny sposób z czystym filtrem wg punktu 5.10. Tak przygotowane próbki należy wytrząsać przez 30 min, a następnie przesączyć roztwory znad filtrów przez filtry strzykawkowe wg punktu 5.12. Otrzymane roztwory należy analizować chromatograficznie w warunkach określonych w rozdziale 8.

Wykonać dwukrotny pomiar. Odczytać z uzyskanych chromatogramów powierzchnie pików wg wskazań integratora i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami a wartością średnią nie powinna być większa niż 5% wartości średniej.

Stężenie kwasu benzoesowego w badanym roztworze odczytać z wykresu krzywej wzorcowej, w mikrogramach na mililitr.

W taki sam sposób wykonać oznaczanie z ekstrakcji próbki ślepej.

11. Wyznaczanie wydajności ekstrakcji

W pięciu kolbach stożkowych wg punktu 5.13 umieścić filtr wg punktu 5.10. Następnie na filtry nanieść po 25 µl roztworu kwasu benzoesowego do badania ekstrakcji wg punktu 5.8. W szóstej kolbie przygotować próbkę kontrolną zawierającą czysty filtr wg punktu 5.10. Kolby zamknąć i pozostawić do następnego dnia. Oznaczanie badanej substancji wykonać wg rozdziału 10. Jednocześnie

wykonać oznaczanie badanej substancji co najmniej w trzech roztworach porównawczych przygotowanych przez dodanie 25 µl roztworu kwasu benzoesowego do badania ekstrakcji wg punktu 5.8 do 10 ml wodnego roztworu metanolu wg punktu 5.5. Wydajność ekstrakcji dla kwasu benzoesowego (d) obliczyć wg wzoru:

$$d = \frac{(P_d - P_o)}{P_p}$$

w którym:

- P_d – średnia powierzchnia pików kwasu benzoesowego roztworów po ekstrakcji,
- P_o – średnia powierzchnia pików o czasie retencji kwasu benzoesowego roztworu kontrolnego,
- P_p – średnia powierzchnia pików kwasu benzoesowego roztworów porównawczych.

Następnie obliczyć średnią wartość wydajności ekstrakcji dla kwasu benzoesowego (\bar{d}) jako średnią arytmetyczną otrzymanych wartości (d).

Wydajność ekstrakcji należy wyznaczać dla każdej nowej partii filtrów.

12. Obliczanie wyniku oznaczania

Stężenie kwasu benzoesowego (X) w badanym powietrzu obliczyć, w miligramach na metr sześcienny, wg wzoru:

$$X = \frac{c_1 \cdot 10}{V \times \bar{d}}$$

w którym:

- c_1 – stężenie kwasu benzoesowego w roztworze uzyskanym znad filtra, odczytane z krzywej wzorcowej, w mikrogramach na mililitr,
- 10 – całkowita objętość badanego roztworu, w mililitrach,
- V – objętość powietrza przepuszczonego przez filtr i rurkę pochłaniającą, w litrach,
- \bar{d} – średnia wartość wydajności ekstrakcji wyznaczona wg rozdziału 11.

Adres do korespondencji/Contact details:

MAŁGORZATA SZEWCZYŃSKA
e-mail: mapol@ciop.pl
Centralny Instytut Ochrony Pracy –
Państwowy Instytut Badawczy
00-701 Warszawa, ul. Czerniakowska 16
POLAND

